Aus dem Institut für angewandte Physiologie in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. D. W. Lübbers

Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente am isoliert perfundierten Meerschweinchengehirn in vivo und in Hypothermie von 18° C

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Dieter Schwickardi

aus Kassel

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für angewandte Physiologie in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. D. W. Lübbers

Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente am isoliert perfundierten Meerschweinchengehirn in vivo und in Hypothermie von 18° C

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Dieter Schwickardi

aus Kassel

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 22. Febr. 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. A. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. D. W. Lübbers
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Schimassek

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung ..... 1 - 2

II. Methodik ..... 3 - 9
1. Narkose und Operation 3
2. Güte des Präparates 4
3. Aufnahmetechnik der in vivo Spektren 4
4. Herstellung des Homogenates 6

III. Resultate ..... 10 - 43
1. Herstellung eines Kopf-Hirn Präparates .. 10
2. Meß- und Auswertmethoden ..... 13 - 31
a. Auswertung der Spektren 13
b. Redoxzustände und Kinetik der Atmungs - fermente a, b und c 20
c. Ausschaltung des Störeinflusses von Hämoglobin bei der Auswertung 20
d. Messung der Atmungsfermentkonzentration im Homogenat 21
e. Atmungsfermentkonzentration im mensch - lichen Gehirnhomogenat 24
f. Prüfung des Auswertverfahrens durch zeichnerische Superposition der Spektren 29
3. Meßergebnisse ..... 32 - 43
a. Isosbestische Punkte 32
b. Cytochromkonzentrationen 32
c. Redoxstatus in vivo und Hypothermie von 18° C 37
d. Cytochromkinetik bei Hypothermie 37
e. Cytochromkonzentrationen am menschlichen Gehirn 41

IV. Diskussion ..... 44 - 50

V. Zusammenfassung 51

VI. Literaturverzeichnis ..... 52 - 54

I. EINLEITUNG

Das Warmblütergehirn ist zur Deckung seines normalen Energiebedarfs auf eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr angewiesen. Die energieliefernden Reaktionen des Sauerstoffs erfolgen in der Atmungskette, die in den Mitochondrien gelegen ist. Daher besteht eine enge Beziehung zwischen der Konzentration der Atmungsfermente und der Atmungsintensität. Neben der Konzentration ist die Kenntnis der kinetischen Daten der Atmungsfermente von großer Bedeutung.

Die bisherigen Untersuchungen wurden meist an isolierten Mitochondrien angestellt. Da die kinetischen Daten aber stark vom äußeren Milieu beeinflußt werden, wurde in der vorgelegten Arbeit versucht, die Kinetik und die Konzentrationen im Gehirn in vivo und in situ zu messen. Es zeigte sich, daß die Messungen am normal durchbluteten Tier mit den zur Zeit bekannten Methoden nicht möglich sind, da das Absorptionsspektrum des Haemoglobins das Spektrum der Atmungsfermente völlig überlagert.

In Zusammenarbeit mit KNAUST (11) wurde eine Methode zur haemoglobinfreien Perfusion des Gesamthirns in Hypothermie erarbeitet.

Die Konzentration und die Kinetik der Atmungsfermente wurde mit dem Rapidspektrometer der Kieler Howaldwerke nach LÜBBERS und NIESEL (17) im reflektierten Licht gemessen. Zur quantitativen Auswertung der Reflektionsspektren wurde empirisch eine ausreichend genaue Methode entwickelt.

Die Konzentrationen der Atmungsfermente des Gehirns

sind hoch (21), die relativen Konzentrationen ent - sprechen den in den Mitochondrien gefundenen Werten.

Zum Schluß der Arbeit wird gezeigt, daß auch mit der erarbeiteten Methode am nicht perfundierten haemo - globinhaltigen Hirnhomogenat Konzentrationsbestimmungen der Atmungsfermente mit ausreichender Sicherheit gemacht werden können. Da sich ergab, daß nach 12 -15 Stunden post mortem (bei 4^{o} C) noch keine Veränderungen an den Spektren der Atmungsfermente auftraten, konnte die Konzentration des menschlichen Gehirns differenziert nach Rinde und weißer Substanz bestimmt werden.

II. METHODIK

1. Narkose und Operation

Als Versuchstiere verwendeten wir Meerschweinchenböcke, die ein Gewicht von 400 - 500 g aufwiesen und noch nicht in der Zucht verwendet worden waren. Als Narkotikum erwies sich Nembutal in einer Konzentration von 0,1 ml/100 g Tier für unsere Versuche als geeignet. Zusammen mit dem Nembutal injizierten wir 0,1 ml Atropin pro Tier intraperitoneal. Zeigten die Tiere nach 30 Minuten noch keine Wirkung, so wurde die Injektion mit 2/3 der Anfangsdosis wiederholt, da dann anzunehmen war, daß die erste Injektion in den Darm erfolgt war. Dort kommt aber Nembutal nur abgeschwächt zur Wirkung.

Sobald die Tiere schliefen, was nach ca. 20 Minuten der Fall war, wurde an der hinteren Extremität die Vena femoralis freipräpariert und 0,5 ml Liquemin, das entspricht 250 IE, injiziert. Das Operationsbrett war auf einem Mikromanipulator (Fa. Leitz) montiert, um während des Versuchs kleinste Bewegungen vor dem Photometer mit dem Tier ausführen zu können.

Anschließend wurden die Tiere tracheotomiert, wobei die Trachea für ca. 1 cm mobilisiert wurde, um einen stumpfen Katheter einzuführen. Der Katheter wurde so fixiert, daß er keinen Zug auf die Halsgefäße ausüben konnte, da er sonst die Zirkulation gestört hätte.

Sobald die künstliche Beatmung des Tieres gewähr-

leistet war, wurde die Schädelkalotte freigelegt und mit einem angefeuchteten Tupfer abgedeckt. Die Kalotte blieb bis zum Einbinden der Gefäßkatheter erhalten, da wir die Erfahrung gemacht hatten, daß sich bei zu zeitiger Trepanation Gefäßreaktionen abspielen, die eine gute Sauerstoffversorgung der Hirnrinde unmöglich machen.

2. Güte des Präparates

In mehreren Vorversuchen stellten wir fest, daß sich die Atmungsfermente eines gut mit Sauerstoff versorgten Gehirns bei einer Oberflächentemperatur von 18°C nach Abschaltung der Perfusion in 3 1/2 Minuten reduzieren. Die Reduktionszeit, die von der Größe der Gewebsatmung und der Sauerstoffreserve abhängt, läßt sich als Kriterium für die Güte des Präparates verwenden. Sie wurde folgendermaßen ermittelt:

Bei Versuchsbeginn wurde ein Spektrum zwischen 530 und 620 nm der oxydierten Atmungsfermente eingestellt und die Perfusion unterbrochen. Reduzierten sich die Atmungsfermente nicht binnen 4 Minuten, so wurde der Versuch nicht fortgesetzt, da dann ein durch die Operation vorgeschädigtes Gehirn vorlag. Anderenfalls setzten wir die Perfusion nach 4 Minuten fort. Siehe Abb. 1.

3. Aufnahmetechnik der in vivo Spektren

Der auf die Hirnoberfläche auftreffende Lichtstrahl war 0,5 x 0,2 cm groß. Die photometrischen Messungen er-

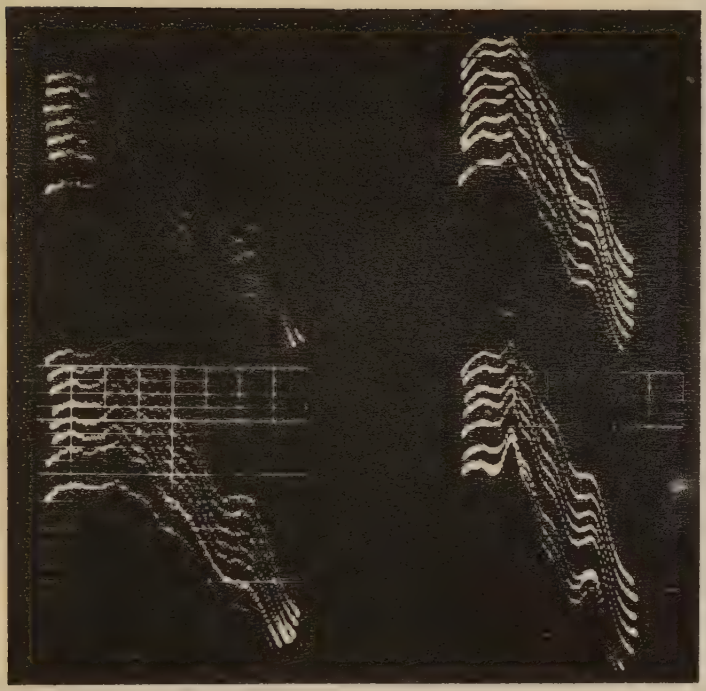

Abb. 1 Anoxiezyklus

Die linke Serie zeigt von unten nach oben das Verhalten der Atmungsfermente nach Perfusionsstopp. Die unterste Kurve zeigt ein oxydiertes Hirnspektrum. Alle 15 sec wurde eine weitere Aufnahme gemacht, bis nach 4 min die Atmungsfermente völlig reduziert sind. Die rechte Serie zeigt denselben Vorgang in umgekehrter Reihenfolge und 4 sec Aufnahmeabstand.

folgten auf einem motorischen Areal, was durch mechanische Reizungen festgestellt worden war. Siehe Abb. 2.

Bei Ischämiezyklen wurde alle 15 Sekunden nach Stoppen der Perfusion ein Spektrum aufgenommen, bis eine völlige Reduktion der Atmungsfermente vorlag. Dies läßt sich daran erkennen, daß die letzten Spektren deckungsgleich waren. Unsere Aufnahmetechnik ermöglichte es, acht Spektren auf ein Bild übereinander zu photographieren. Jeder Ischämiezyklus lieferte 16 Spektren (Abb. 1), was einer Zeit von 3 Minuten und 45 Sekunden entspricht. Dann wurde die Perfusion fortgesetzt und während der Reoxygenierung alle 4 Sekunden ein Spektrum aufgenommen, da die Oxydation der Atmungsfermente wesentlich schneller vor sich geht. Bei 16 Spektren entspricht das einer Zeit von 1 Minute.

Mit dem Rapidspektrometer kann man Absolutspektren und auch Differenzspektren aufzeichnen. Bei den ersteren liegt das Hirn im Meßstrahl und ein frequenzunabhängiges lichtabsorbierendes Filter im Vergleichsstrahl, bei letzterem liegt ein Hirnhomogenat im Vergleichsstrahl. Da in mehreren Versuchen festgestellt wurde, daß die Messungen der Absolutspektren ebensogut auszuwerten waren wie die Differenzspektren, beschränkten wir uns auf die Absolutspektren.

4. Herstellung des Homogenates

Zur Konzentrationsbestimmung wurde bei einigen Meerschweinchen, nachdem der Kopf haemoglobinfrei perfundiert worden war, die Kalotte vollständig abgetragen und die Hirne nach Durchtrennung des Rückenmarkes im Foramen magnum und der Hirnnerven herausgehoben und gewogen. Dann wurden

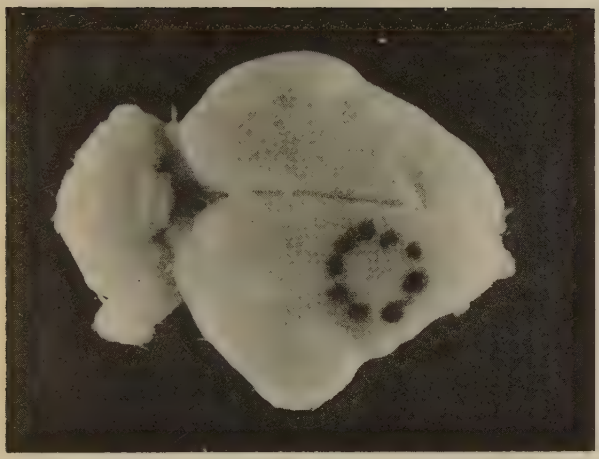

Abb. 2

Die Abbildung zeigt ein 3,8 g schweres Meerschweinchengehirn mit eingezeichnetem Meßareal. Über diesem motorischen Areal wurden die Messungen gemacht.

die Hemisphären durchtrennt, die eine in toto zu Homo - genat aufgearbeitet und 1 : 10 verdünnt. Die andere Hemi - sphäre wurde differenziert nach Rinde, weißer Substanz und Thalamus aufgearbeitet und ebenfalls 1 : 10 verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit unserem Perfusionsmedium (11). Zur Konzentrationsbestimmung standen uns also vier Homogenate zur Verfügung.

Oxydierte Spektren erhielten wir folgendermaßen : Dem Perfusat am Schluß eines Versuches wurde 1 ml 1molares Amytal zugesetzt, das nach LEHNINGER (12) die Atmungskette zwischen dem gebundenen Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und dem Flavoprotein blockiert. Anschließend wurde das Gehirn homogenisiert und durch das Homogenat ließen wir Sauerstoff perlen. Die Reduktion der Atmungsfermente erfolgte mit Natriumdithionit oder durch die Eigenatmung eines luftdicht abgeschlossenen Homogenates.

Die reduzierten oder oxydierten Homogenate wurden in 0,5 cm dicke Kuvetten gefüllt und im durchfallenden Licht gemessen. Für stark verdünnte Lösungen gilt in guter An - näherung das LAMBERT-BEER'sche Gesetz (siehe Seite 14). Wenn die molaren Extinktionskoeffizienten ε_m für die Atmungsfermente (5, 22) bekannt sind, lassen sich damit die Konzentrationen bestimmen. Zur Auswertung werden am zweck - mäßigsten die isosbestischen Punkte benutzt.

Die Konzentrationen errechnen sich nach folgender Formel :

$$c = \frac{E_g}{\varepsilon_m \times d \times V}$$

c- Konzentration
E_g-Extinktion gemessen
V -Verdünnung 1 : 10
d -Kuvettendurchmesser
ε_m-Extinktionskoeffizient

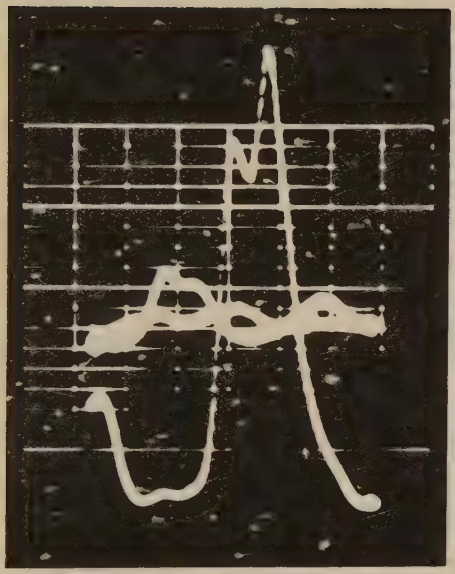

Abb. 3

Reduziertes und oxydiertes Homogenatspektrum mit Filter.

III. RESULTATE

1. Herstellung eines Kopf-Hirn Präparates

Das Operationsverfahren war so angelegt, daß ein möglichst großer Teil des Perfusates durch das Meerschweinchengehirn lief.

Zur Thorakotomie wurde das Fell über dem Sternum durchtrennt und nach beiden Seiten bis in die vordere Axillarlinie stumpf abpräpariert. Die in der Axilla gelegenen Gefäße - A.axillaris, A. mammaria interna, Tr. cervicalis und der Tr. costocervicalis - wurden angeschlungen. Bauch und Brustmuskulatur mit den Aa. und Vv. epigastricae wurden im epigastrischen Winkel mit dem Thermokauter durchtrennt, Abb.4. Dann wurde der Thorax mit einem im Sternum verlaufenden Längsschnitt eröffnet. Im 2. ICR wurde auf beiden Seiten die A. thoraxica interna unterbunden und dann nach zwei weiteren Schnitten längs der 10. Rippe mit dem Thoraxspreizer Herz und Lungen dargestellt. Bindegewebige Verwachsungen der Pleurablätter und der Nervus phrenicus wurden durchschnitten und schon jetzt die V. cava caudalis angeschlungen. Eine weitere Ligatur kam nach Eröffnung des Herzbeutels im Sinus coronarius um die Aorta und die A. pulmonalis zu liegen. Dann wurde die linke Lunge vorsichtig nach rechts herübergehoben und die Aorta mobilisiert. Da die Meerschweinchengefäße sehr leicht zerreißen, muß die Mobilisierung scharf erfolgen. Die V. azygos darf dabei nicht verletzt werden, um eine einwandfreie Perfusion zu sichern. Die Aorta wurde im abfallenden Schenkel mit einer geschützten Klemme gefaßt und dicht über dem Diaphragma eröffnet. Ein stumpfer Katheter aus PVC wurde unter leicht drehenden Bewegungen eingeführt und dann fixiert.

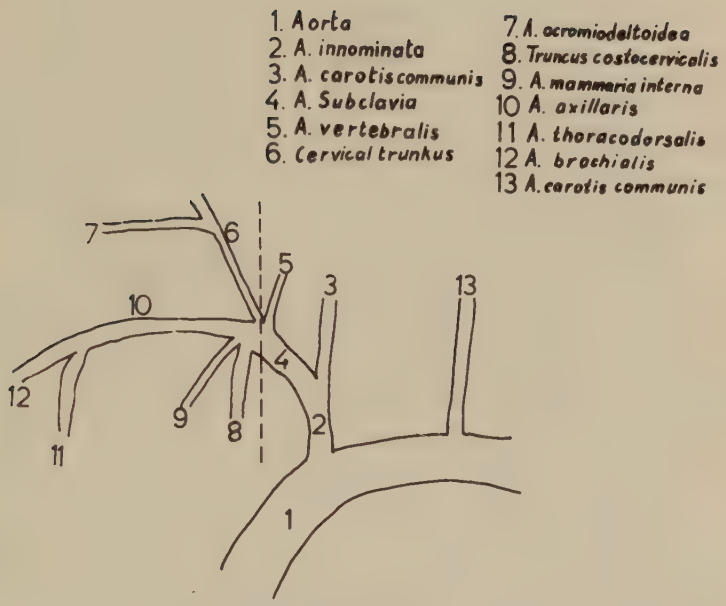

Abb. 4

Die Abbildung zeigt den Gefäßverlauf in der rechten Axilla des Meerschweinchens. Die gestrichelte Linie markiert die Ligatur.

Gleichzeitig wurde die Klemme geöffnet und die Perfusion begonnen. Ein mehrfach seitlich durchlöcherter V_{2A}- Katheter wurde in die schon vorher angeschlungene V. Cava caudalis eingebracht, bis in das rechte Herz vorgeschoben und dort fixiert.

Nachdem dann die Ligaturen um die Aorta und die A. pulmonalis und die in den Axillae gelegenen, zugezogen worden waren, hatten wir das gewünschte Kopf-Hirn-Präparat. Bei dieser Perfusionsmethode laufen 15 - 20 % des Perfusats durch das Gehirn des Meerschweinchens (11).

Jetzt wurde das Versuchstier in die Bauchlage gewendet, wobei sich der Katheter aber nicht verlagern durfte, damit der arterielle Zustrom nicht gestört wurde. Dann wurde die Trepanation mit einem Zahnbohrer begonnen und nachdem ein Loch in die Kalotte gebohrt worden war, wurde der Knochen weiter mit einer Knochenzange behutsam abgetragen. Besondere Sorgfalt ist bei der Darstellung des Sinus sagittalis notwendig, der auf Grund s einer anatomischen Lage sehr leicht verletzt wird. Die Meningen dürfen nicht mechanisch gereizt werden, da es sonst zu irreversiblen Gefäßspasmen kommt (23), wie die mikroskopische Beobachtung zeigt. Für unsere Messungen war es auch wichtig, den Liquorraum unbeschädigt zu erhalten, um unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Die Meningen erwiesen sich für unsere Messungen nicht als störend. Das ca. 1 qcm große Fenster in der Kalotte brachten wir in 0,5 cm Abstand vom Meßkopf in den Meßstrahl des Photometers.

Der gesamte operative Vorgang dauerte einschließlich Narkose und Fensterung der Kalotte 45 Minuten, dabei wurde aber während der Kalottenfensterung schon perfundiert.

2. Meß- und Auswertmethoden

a) Auswertung der Spektren

Bei der Auswertung der Homogenatspektren und besonders der Reflexionsspektren in vivo zeigte es sich, daß die Nullinie keine Gerade ist. Man kann das daran erkennen, daß die Extinktionswerte bei den isobestischen Punkten gegenüber deren normalen Spektrum verschoben sind. Bei starken Verschiebungen kann das übliche Auswertverfahren, bei dem die Extinktionsdifferenz zwischen isosbestischem Punkt und Extinktionsmaximum ausgemessen wird, nicht ohne weiteres benutzt werden. Hier müssen nach NIESEL und SCHMITT (20) mindestens zwei isosbestische Punkte berücksichtigt werden. Sind die Extinktionen und die Extinktionsänderungen klein, so kann man nach einem anderen Verfahren genauer auswerten. Rein empirisch zeigten NIESEL, THEWS und LÜBBERS, (19), daß sich aus der Steigung einer an das Hb-Spektrum angelegten Tangente der Oxydationsgrad und die Konzentration bestimmen lassen. Der Nachteil dieser Methode ist, daß sie keine lineare Eichkurve ergibt.

Das unten angegebene Verfahren hat diese Nachteile nicht, es läßt sich besonders gut anwenden, wenn Absorptionsmaxima vorhanden sind. Es benutzt die Tatsache, daß sich bei einer Kurve der Winkel der Tangente mit großer Genauigkeit bestimmen läßt.

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt für das Extinktionsspektrum einer Substanz für die Wellenlänge λ

$$E_{(\lambda)} = c \cdot d \cdot \varepsilon_{m(\lambda)} \qquad (1)$$

$E_{(\lambda)}$ = Extinktion
c = Konzentration
d = Kuvettendicke
$\varepsilon_{m(\lambda)}$ = molarer Extinktions - koeffizient

Ebenso wie die Extinktion ist die Steigung der Tangente an das Extinktionsspektrum bei einer bestimmten Wellen - länge λ proportional der Konzentration.

$$\frac{dE_{(\lambda)}}{d\lambda} = c \cdot d \cdot \frac{d\varepsilon_{(\lambda)}}{d\lambda} = c \cdot d \cdot \operatorname{ctg} \sigma_m \qquad (2)$$

$$\frac{dE_{(\lambda)}}{d\lambda} = \operatorname{tg} \alpha = \operatorname{ctg} \sigma \qquad (3)$$

Abb. 5 Seite 15

$$c = \frac{\operatorname{ctg} \sigma}{d \cdot \operatorname{ctg} \sigma_m} \qquad (4)$$

Liegt ein symmetrisches Absorptionsmaximum vor, so be - stimmt man zweckmäßigerweise den Gesamtwinkel und nimmt davon die Hälfte $\frac{\gamma}{2}$.

Abb. 6 Seite 15

Wenn die Nullinie im Bereich des Absorptionsmaximums stark geneigt ist, so muß diese Neigung berücksichtigt werden. Dies wird folgendermaßen erreicht :
In Dreieck I ist der 'Peak' mit der Höhe h auf gerader Null- linie dargestellt, in Dreieck II der gleiche Peak mit der Höhe h' (h' = h) auf schräger Nullinie.

Abb. 7 Seite 16

Aus den Winkeln α und β von Dreieck II kann der entsprechende Winkel σ berechnet werden :

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{b + h'}{a} \qquad (5)$$

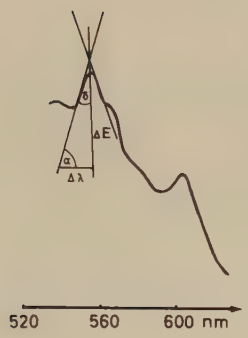

Abb. 5 zeigt ein in vivo Spektrum mit angelegter Tangente und den zur Errechnung der Konzentration wichtigen Größen ΔE, $\Delta\lambda$ und den Winkel δ.

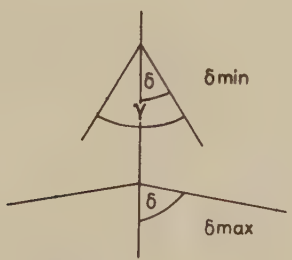

Abb. 6 zeigt den aus den Tangenten an das in vivo Spektrum gebildeten Gesamtwinkel γ. Für unsere Rechnung ist aber nur $\frac{\gamma}{2} = \delta$ erforderlich.

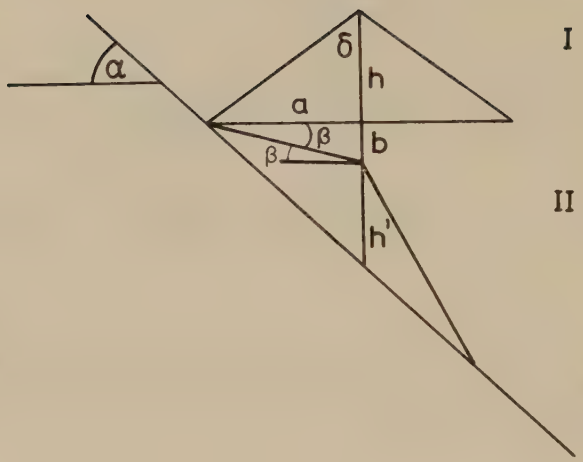

Abb. 7
In Abb. 7 sind die beiden Katheten (Tangenten) an ein Spektrum mit waagrechter Nullinie gelegt : Dreieck I. Bei Dreieck II ist die Nullinie geneigt und dadurch die Höhe h' + b. Diese Nullinienverschiebung ist in Formel 4 und 5 berücksichtigt.

$$\operatorname{tg}\beta = \frac{b}{a} = \operatorname{ctg}\sigma \qquad (6)$$

$$\operatorname{tg}\alpha = \operatorname{tg}\beta = \frac{b+h'}{a} - \frac{h}{a} = \operatorname{ctg}\sigma \qquad (7)$$

Bei der Festlegung des Winkels β muß das Vorzeichen beachtet werden. Der Winkel β wird negativ, wenn der 'Peak' über die Grundlinie des "normalisierten" 'Peaks' herausragt.

Besteht die Substanz $E_{1,2(\lambda)} = c\ d\ \varepsilon_{(\lambda)}$ aus zwei Komponenten mit den molaren Extinktionen $f_{(\lambda)}$ und $g_{(\lambda)}$, so folgt :

$$E_{1(\lambda)} = a\ c\ d\ f_{(\lambda)} = a\ D_{max} \qquad (8)$$

$$E_{2(\lambda)} = b\ c\ d\ g_{(\lambda)} = b\ D_{min} \qquad (9)$$

$$E_{1,2(\lambda)} = c\ d\ k_{(\lambda)}$$
$$= a\ c\ d\ f_{(\lambda)} + b\ c\ d\ g_{(\lambda)} \qquad (10)$$

wobei $a + b = 1$ ist.

$$\frac{dE_{1,2(\lambda)}}{d\lambda} = a\frac{dD_{max}}{d\lambda} + b\frac{dD_{min}}{d\lambda} \qquad (11)$$

Nach Abb. 4, 6 und 8 kann dafür der $\operatorname{ctg}\sigma$ eingesetzt werden:

$$\operatorname{ctg}\sigma = a\ \operatorname{ctg}\sigma_{max} + b\ \operatorname{ctg}\sigma_{min} \qquad (12)$$

da $b = 1 - a$ ist, ist der Anteil der Komponente b in Prozent:

$$b = \frac{\operatorname{ctg}\sigma - \operatorname{ctg}\sigma_{max}}{\operatorname{ctg}\sigma_{min} - \operatorname{ctg}\sigma_{max}}\ 100\ \% \qquad (13)$$

Ist der Anteil der Komponenten bekannt, so findet man die Konzentration c :

$$c\left(a\ d\ \frac{df_{(\lambda)}}{d\lambda} + b\ d\ \frac{dg_{(\lambda)}}{d\lambda}\right) = \frac{dE_{1,2(\lambda)}}{d\lambda} \qquad (14)$$

$$c = \frac{\frac{dE_{1,2}(\lambda)}{d\lambda}}{d\left(a\frac{df(\lambda)}{d\lambda} + b\frac{dg(\lambda)}{d\lambda}\right)} = \qquad (15)$$

$$c = \frac{\operatorname{ctg}\sigma}{d\,(1-b)\operatorname{ctg}\sigma_{max} + b\operatorname{ctg}\sigma_{min}} \qquad (16)$$

Im Falle der Atmungsfermente bestehen die beiden Komponenten aus oxydiertem und reduziertem Cytochromen.

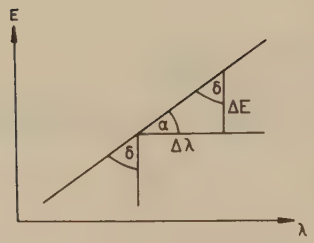

Abb. 8
Die geometrischen Beziehungen zeigen, daß für $\operatorname{tg}\alpha = \frac{\Delta E}{\Delta\lambda}$ auch $\operatorname{ctg}\sigma = \frac{\Delta E}{\Delta\lambda}$ gesetzt werden kann.

- An dieser Stelle möchte ich Herrn Dipl. Physiker Wodick aus dem Inst. für angewandte Physiologie für seine Hilfe herzlich danken.

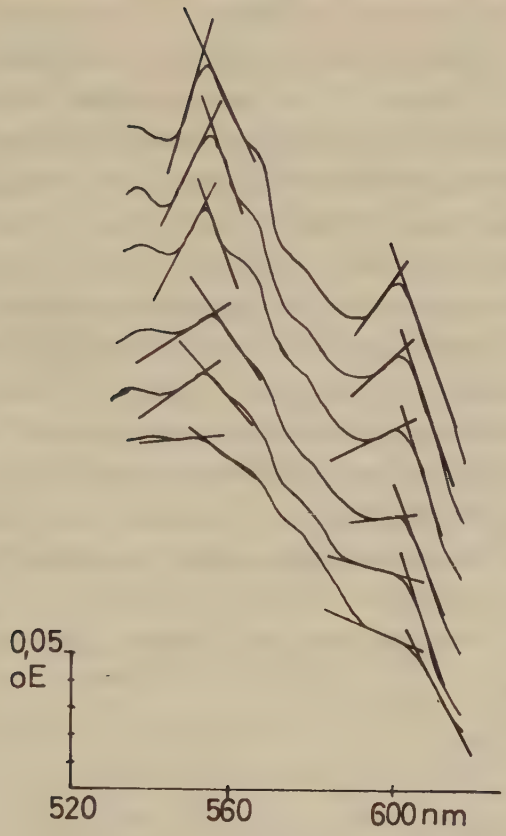

Abb. 9 Auswertbeispiel
Die Abbildung zeigt sechs in vivo Spektren mit angelegten Tangenten an die Absorptionsmaxima der Cytochrome a und c.

b) Redoxzustände und Kinetik der Atmungsfermente a, b und c

Den Redoxzustand und die Kinetik von Cytochrom a kann man durch Messung der Extinktionsänderung am Absorptionsmaximum bei 604 nm bestimmen. Dazu wurde bei den während der Anoxiezyklen und bei normaler Perfusion aufgenommenen Spektren die Tangente an das Absorptionsmaximum angelegt und die Winkel (ctg σ) gemessen. Die Berechnung erfolgte nach der auf Seite 17 angegebenen Formel 13, wobei der ctg des gemessenen Winkels dem jeweiligen Redoxzustand entspricht. ctg σ_{min} und ctg σ_{max} beziehen sich auf völlige Reduktion bzw. auf völlige Oxydation.

Zur Bestimmung von Cytochrom c kann die gleiche Formel 13 angewandt werden, doch liegt hier ein Sonderfall vor, da das voll sauerstoffgesättigte Cytochrom c im Spektrum eine Gerade bildet. Somit ist für ctg = 90° $\sigma_{min} = 0$. Dadurch wird die Formel (11) folgendermaßen vereinfacht:

$$c = \frac{\text{ctg } \sigma}{\text{ctg } \sigma_{min}} \quad 100\ \%$$

c) Ausschaltung des Störeinflusses von Haemoglobin bei der Auswertung

Geringe Verunreinigungen an Haemoglobin lassen sich auch bei sehr guter Perfusion nicht vermeiden. Diese Restmengen beeinflussen das Absorptionsmaximum des Cytochrom b. Die Menge und die Sättigung des Haemoglobins läßt sich nach dem oben beschriebenen Verfahren am Absorptionsmaximum bei 578 bestimmen. Ist die Haemoglobinmenge bekannt, so kann

der Einfluß des Haemoglobins auf die Absorption des Cytochrom b errechnet werden. Damit ergibt sich die gesuchte Menge an Cytochrom b.

Zur Auswertung wurde eine Kurvenschar von Haemoglobinspektren verschiedener Sauerstoffsättigung konstruiert. Die Kurvenschar wurde in einem solchen Maßstab gezeichnet, daß sich die auf Film aufgenommenen Hirnspektren mit Hilfe eines Vergrößerungsapparates so aufeinander projizieren ließen, daß die isosbestischen Punkte zur Deckung kamen.

Auf diese Weise gewinnt man eine Differenzkurve, in der man zwei benachbarte isosbestische Punkte verbinden kann. Fällt man dann bei 562 nm das Lot auf diese Verbindungslinie, so kann ΔE gemessen werden, und daraus der Redoxzustand des Cytochroms b errechnet werden.

d) Messung der Atmungsfermentkonzentrationen im Homogenat

Zur Konzentrationsbestimmung der Atmungsfermente in vivo im reflektierten Licht wurden zunächst am Hirnhomogenat Messungen gemacht. Hierbei wurden 0,5 cm dicke Kuvetten verwendet, nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß bei dieser Kuvettendicke im reflektierten Licht keine Signaldifferenzen entstehen, wenn die Reflektionsbedingungen des Untergrundes verändert werden. Die Kuvetten wurden annähernd rechtwinklig in den Meßstrahl gebracht in einem Abstand von 0,5 cm vom Meßkopf, Abb. 12.

Beim Vergleich der aufgenommenen Homogenatspektren im durchfallenden und im reflektierten Licht stellten wir fest, daß die Extinktionen im reflektierten Licht geringer

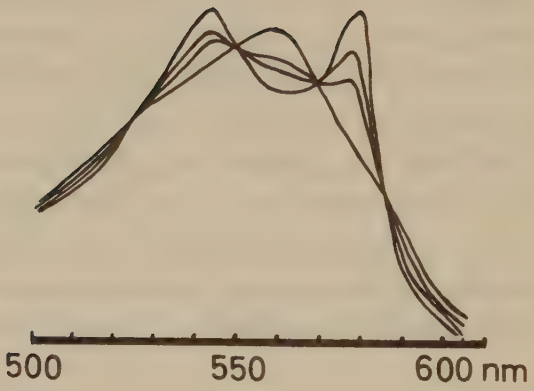

Abb. 10
Als Beispiel für eine Haemoglobinkurvenschar werden vier Kurven mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen abgebildet.

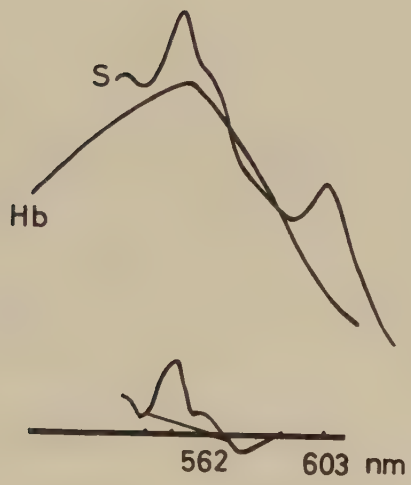

Abb. 11
In ein in vivo Spektrum ist ein Haemoglobinspektrum der gleichen Sauerstoffsättigung gezeichnet. Darunter ist das Differenzspektrum zu sehen, aus dem die Konzentration des Cytochrom b bestimmt werden kann.

waren. Da die Konzentration in beiden Messungen gleich ist, muß diese Extinktionsabnahme auf eine effektive Schichtdickenverkleinerung zurückzuführen sein. Die Extinktion im reflektierten Licht würde einer Schichtdicke von Gehirnhomogenat entsprechen, die um den Faktor 3,19 reduziert ist.
Abb. 13 , Tabelle 1 und 2

e) Atmungsfermentkonzentrationen am menschlichen Gehirnhomogenat

Nachdem die Atmungsfermentkonzentrationen am haemoglobinfreien Meerschweinchengehirn bestimmt worden waren, versuchten wir, auch die Konzentrationen am menschlichen Gehirn zu ermitteln.

Hierfür stand uns aber nur Hirnsubstanz aus dem Sektionsgut der Pathologie zur Verfügung, Dieses Material wurde nach der Sektion sofort homogenisiert und photometrisch ausgewertet. Zur Aufarbeitung gelangten Stücke aus der Rinde und der weißen Substanz. Eine große Schwierigkeit lag darin, daß trotz intensiven Spülens das Haemoglobin nicht vollständig aus dem Homogenat entfernt werden konnte. Daher mußten wir, um diesen Störfaktor auszuschalten, zur weiteren Auswertung die Haemoglobinkonzentration bestimmen. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte nach dem oben geschilderten Verfahren. Die bei 568 und 580 nm gelegenen isosbestischen Punkte wurden verbunden und auf dieser Verbindungslinie bei 578 nm das Lot gefällt. Mit dieser Haemoglobinkonzentration wurden sowohl oxydierte als auch reduzierte reine Haemoglobinspektren gezeichnet. Wie bei der für Cytochrom b beschriebenen Methode wurden sie aufeinanderprojiziert. Dann ergab sich eine Differenzkurve, aus der man die Konzentration der Atmungsfermente a und c berechnen konnte.

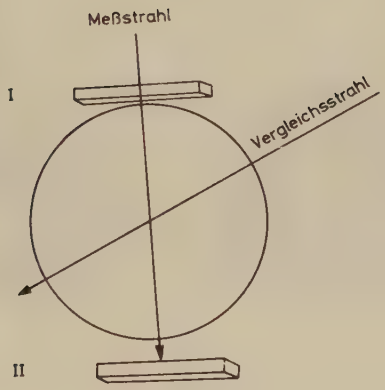

Abb. 12
zeigt den Meßkopf des Photometers mit dem Verlauf des Meß- und Vergleichsstrahles und die Lage der Kuvetten.

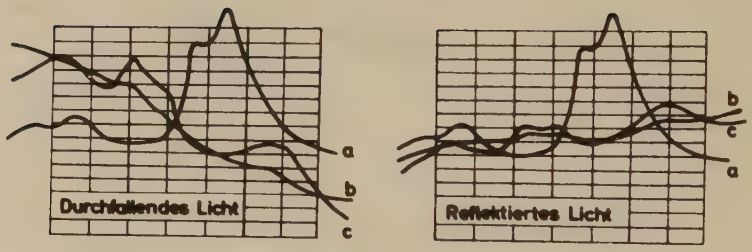

Abb.13
zeigt links ein in vivo Spektrum im durchfallenden Licht und rechts dasselbe Spektrum im reflektierten Licht.
a - Neodymfilter ; b - oxydiertes Homogenatspektrum
c - reduziertes Homogenatspektrum

	Hirn						Rinde						weiße Substanz						Thalamus					
Nr	1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10		1 : 10	
	a DL	a RL	b DL	b RL	c DL	c RL	a DL	a RL	b DL	b RL	c DL	c RL	a DL	a RL	b DL	b RL	c DL	c RL	a DL	a RL	b DL	b RL	c DL	c RL
1.	14,2	4,16	16,9	6,3	17,9	5,3	19,2	5,0	22,8	7,0	22,1	6,3	11,7	3,76	13,6	4,2	13,7	4,2	9,6	4,1	12,9	4,1	11,6	4,3
2.	12,5	4,4	21,0	8,0	15,8	5,0	16,6	3,6	19,1	6,9	21,1	5,3	8,5	3,3	12,8	4,2	14,7	3,7	10,8	2,9	10,5	3,3	13,9	3,7
3.	10,0	4,2	18,3	6,9	12,4	7,0	12,5	4,6	16,4	5,4	15,0	5,3	8,5	3,7	12,5	4,0	10,5	5,16	12,5	4,16	12,4	4,2	14,8	4,7
4.	10,0	3,4	16,4	4,7	13,2	3,9	12,0	5,4	30,4	9,6	14,5	7,4	10,8	4,6	15,3	4,9	12,7	4,8	10,8	3,0	13,0	4,5	12,6	4,4
5.	15,8	3,0	15,8	4,9	18,4	4,0	12,4	4,16	27,2	9,1	15,8	6,3	10,9	4,6	14,7	4,9	14,4	6,8	8,7	3,0	9,8	3,0	11,0	3,9
6.	12,5	4,8	22,5	7,1	15,8	5,3	13,3	4,4	24,5	7,9	17,9	6,06	15,0	4,5	14,9	4,9	21,0	5,4	10,2	3,4	10,0	3,4	14,4	4,1
7.	10,4	4,7	20,9	6,7	15,8	5,8	14,4	5,1	18,5	6,2	17,9	5,9	10,6	4,1	12,7	4,1	16,8	5,06	12,1	3,9	12,1	4,2	14,1	4,8
8.	11,4	4,16	21,0	6,8	12,7	4,8	16,7	4,8	22,4	7,0	24,0	5,4	12,3	3,5	13,0	4,3	17,2	4,4	12,4	3,2	10,9	4,0	13,8	4,1
9.	10,3	3,9	16,1	5,0	13,2	4,7	10,0	5,4	20,8	6,1	15,8	7,2	10,0	3,3	12,6	3,9	12,1	3,9	8,4	4,2	11,0	4,0	10,2	4,6
10.	12,6	4,0	18,3	5,6	15,4	4,9	11,7	3,7	17,9	6,3	17,9	4,9	9,4	3,9	10,5	3,6	12,4	6,0	11,0	3,7	9,9	3,6	13,3	4,0
11.	13,7	3,4	14,5	5,0	16,1	4,6	13,7	4,8	19,4	6,8	18,4	6,3	11,8	4,0	11,2	4,0	16,3	5,3	9,5	3,0	10,8	3,9	10,9	3,5
12.	14,4	4,1	15,7	6,1	15,9	5,3	15,2	4,0	19,7	6,6	17,9	5,4	10,1	3,8	13,5	4,5	15,0	4,1	9,2	3,5	12,3	4,3	11,9	3,9
13.	13,7	4,4	15,4	5,8	14,5	5,1	14,9	4,6	25,3	8.5	19,0	6,1	13,9	4,9	16,9	5,3	15,5	5,8	8,3		11,7	4,0	11,0	
14.	12,5	3,8	14,9	4,8	14,8	4,7	16,3	4,1	23,0	7,1	22,0	5,6	11,5	4,7	14,3	5,0	12,9	5,3	8,6		13,1	4,3	12,5	
15.	13,3	4,2	18,1	5,6	16,3	5,7	11,8	5,4	16,9	5,4	16,8	6,9	9,0	3,8	10,8	3,0	11,2	4,1	11,7		10,6	3,7	14,1	
16.	15,8	3,9	17,5	5,6	17,8	4,8	13,6	4,0	21,0	7,2	16,9	5,0	14,3	4,1	12,5	4,4	18,8	6,9						
17.	14.2	4,4	18,2	6,4	17,0	5,6	16,6	3,7	19,9	6,3	20,5	6,2	10,8	4,0	9,7	3,3	14,1	5,4						
18.	10,9	4,6	19,2	5,9	12,2	5,9	14,1		24,1		18,9		12,6	3,7	11,6	3,7	16,7	5,2						
19.	16,0	4,2	20,5	6,7	17,6	5,5	15,0		22,6		19,7		8,7	3,3	12,8	4,1	10,8	4,6						
20.	11,3	3,0	18,1	5,0	13,7	4,2	13,2		18,4		19,1		11,4	3,5	14,0	4,6	14,1	5,0						
21.		4,9		5,6		5,3							9,2	4,8	11,3	4,0	12,3	6,3						
22.		3,9		5,3		4,7								4,0		4,8		5,9						
														4,3		4,6		6,0						

Tabelle 1
Die gemessenen Extinktionswerte der Homogenate im durchfallenden Licht (DL) und die dazugehörenden Werte im reflektierten Licht (R^{L}) werden gegenübergestellt. Die im reflektierten Licht gemessenen Werte sind noch nicht mit dem empirisch gefundenen Faktor von 3,19 korrigiert worden.

	Cytochrom	Anzahl der Versuche	Verdünnung	Faktor	Mittelwert
Gesamthirn	a	18	1 : 5	3,03	3,14
	b	18	1 : 5	3,18	
	c	18	1 : 5	3,20	
Hirnrinde	a	17	1 : 10	3,06	3,09
	b	17	1 : 10	3,10	
	c	17	1 : 10	3,11	
weiße Substanz	a	20	1 : 10	3,22	3,29
	b	20	1 : 10	3,26	
	c	20	1 : 10	3,39	
Thalamus	a	12	1 : 10	3,14	3,26
	b	15	1 : 10	3,41	
	c	12	1 : 10	3,21	

Tab. 2

Aus Tabelle 2 ergibt sich der Umrechnungsfaktor von 3,19 zwischen durchfallendem Licht und reflektiertem Licht.

Zur Kontrolle dieser Messungen am menschlichen Gehirn wurden unter den gleichen Bedingungen, also 12 bis 15 Stunden post mortem bei einer Aufbewahrungstemperatur von 4° C am blutenthaltenden Meerschweinchenhirnhomogenat ebenfalls Konzentrationsbestimmungen durchgeführt, Tabelle 3

Die mit der Differenzkurve ermittelten Werte der Atmungsfermentkonzentrationen am blutenthaltenden Meerschweinchenhirnhomogenat wichen nicht von den Werten ab, die am haemoglobinfreien Hirnhomogenat gefunden worden waren, Tabelle 4

Damit ist nachgewiesen, daß die unter besonderen Bedingungen am Leichengehirn gewonnenen Werte der Atmungsfermentkonzentrationen den am blufreien Homogenat entsprechen.

f) Prüfung des Auswertverfahrens durch zeichnerische Superposition der Spektren

Zur Kontrolle unserer Auswertverfahren konstruierten wir aus den gemessenen Werten der Komponenten das Summenspektrum und verglichen dieses mit dem in vivo Spektrum, Abb. 14.

Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen: Durch die isosbestischen Punkte wurde eine Nullinien gelegt. Diese weicht deutlich von einer Geraden ab. Trägt man auf dieser gebogenen Nullinie die gemessenen Extinktionswerte der Komponenten auf, so entsteht ein Spektrum, daß mit dem Sepktrum des Homogenates identisch ist.

Die isosbestischen Punkte im in vivo Spektrum sind durch optische Reflektionsveränderungen der Gewebe etwas verschoben. Dies muß bei der Konstruktion der Nullinie berücksichtigt werden. Die Verwerfung ist im Reflektionsspektrum stärker als im durchfallenden Licht. Man muß daher bei

	Hb Gehalt im menschlichen Homogenat	Hb Gehalt im Meerschweinchen Homogenat
1	4,2	3,8
2	2,4	4,1
3	4,15	5,0
4	2,0	4,1
5	5,0	2,4
6	2,7	3,2
7	4,15	2,8
8	2,0	3,5
9	3,34	4,4
10	2,5	5,2
11	3,3	3,0
12	2,21	4,7
13	3,3	2,2
14	3,0	2,8
15	3,5	3,8
16	4,1	3,5
17	3,0	3,8
18	4,2	4,3
19	3,6	2,8
20	3,2	5,0
	3,29 g%	3,72 g %
	± 0,84	± 0,89

Tabelle 3
In dieser Tabelle wird der Haemoglobingehalt des Meerschweinchenhirnhomogenates und des Menschenhirnhomogenates verglichen.

	Rinde		Hirn		weiße Substanz		Thalamus	
Nr.	a	c	a	c	a	c	a	c
T 1	13,3	18,2	12,7	15,4	12,4	15,2	8,8	11,1
T 2	13,7	18,4	12,5	14,4	11,6	14,7	9,2	11,9
T 3	14,6	19,9	13,1	15,0	10,8	13,3	9,0	13,0
T 4	12,9	17,8	12,5	14,2	11,5	14,0	10,3	12,2
T 5	14,5	19,5	13,0	14,8	10,4	14,7	9,7	11,7
	13,8	18,7	12,8	14,8	11,3	14,4	9,4	12,0
	Blutfreie Homogenatwerte							
	14,4	17,8	12,9	15,6	10,9	13,8	9,8	12,3

Tabelle 4

In Tabelle 4 sind bei fünf Versuchstieren die Cytochromkonzentrationen unter den Gleichen Bedingungen ermittelt worden, die bei der Auswertung der menschlichen Hirnhomogenate vorlagen. Es sind die Mittelwerte aus diesen fünf Versuchen mit den blutfreien Konzentrationen (Tabelle 6, Seite 38) untereinander aufgeführt.

der Konstruktion des in vivo Spektrums, d.h. eines Reflektionsspektrums, diese stärkere Nullinienabweichung berücksichtigen, Abb. 15.

In Abbildung 14 sind die Spektren eines Anoxiezyklus in vivo aufgezeichnet (ausgezogene Linie). Dazu wurden die nach dem eben beschriebenen Verefahren zusammengesetzten Summenspektren eingezeichnet (gestrichelte Linie). Man sieht, daß die auf so verschiedene Art gewonnenen Spektren praktisch identische sind.

3. Meßergebnisse

a. Isosbestische Punkte

In 18 Versuchen wurden die isosbestischen Punkte für Hirnhomogenat und in 12 Versuchen für die in vivo Spektren bestimmt von 380 - 630 nm. Dabei ergaben sich folgende Werte: Tabelle 5

Homogenat:	383;	421;	456;	515;	530;	545;	567;	590; 616 nm
in vivo :		425;	463;	508;	528;	542;	560;	583; 612 nm
Blut :				510;	527;	549;	568;	580 nm

Es zeigte sich, daß die isosbestischen Punkte des in vivo Spektrums nicht mit denen des Homogenatspektrums übereinstimmten.

b. Cytochromkonzentrationen

In 16 Versuchen wurde die Cytochromkonzentration für a, b und c bestimmt. Die Messungen wurden sowohl im durchfallenden als auch im reflektierten Licht gemacht. Die Messungen im reflektierten Licht wurden mit dem empirisch gefundenen Faktor 3.19 (S 28) korrigiert, Tabelle 2

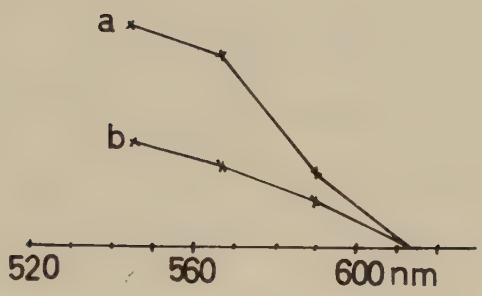

Abb. 14
Die untere Kurve ist die Nullinie der isosbestischen Punkte des Homogenates. Die obere Kurve zeigt den Nulllinienverlauf im in vivo Spektrum.

Abb. 15
Ein konstruiertes und ein in vivo Spektrum sind übereinander gezeichnet worden. Die gepunktete Linie zeigt die Abweichungen des konstruierten Spektrums.

Isosbestische Punkte

1	383	422	456	514	530	545	567	589	613
2	385	421	458	513	530	545	568	588	618
3	383	418	454	518	532	545	569	590	614
4	384	422	455	515	529	543	568	589	614
5	382	420	457	515	527	545	567	588	615
6	386	424	456	514	530	545	566	591	615
7	385	420	458	516	528	544	566	590	614
8	385	418	456	515	530	543	567	589	616
9	385	419	455	516	528	545	566	590	616
10	388	422	454	517	530	545	564	591	615
11	382	420	456	515	532	545	566	590	618
12	383	422	457	514	529	543	568	588	616
13	380	420	456	516	529	546	567	590	618
14	385	421	454	514	530	545	568	590	619
15	381	422	457	516	529	544	567	591	615
16	384	419	455	515	532	545	569	590	613
17	383	421	456	513	531	544	566	591	618
18	385	424	453	517	530	547	566	588	618
19	384	420	455	514	529	543	565	590	616
20	382	422	456	515	532	547	567	591	614
21	383	421	455	515	530	546	566	588	618
22	382	421	457	516	531	544	568	589	618
	383	421	456	515	530	545	567	590	616
	± 1,8	± 1,7	± 1,3	± 1,4	± 1,4	± 1,2	± 1,3	± 1,1	± 1,9

Tabelle 5

In Tabelle5 sind die Werte von 22 Versuchen zusammengetragen und mit Hilfe des arithmetischen Mittels die isosbestischen Punkte bestimmt worden.

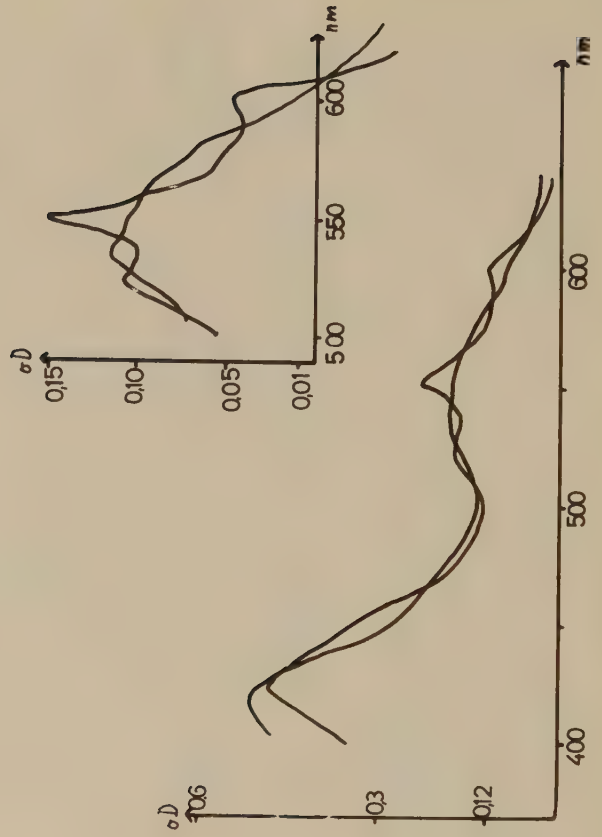

Abb. 16
Atmungsfermentspektrum vom Meerschweinchengehirn

Die von KLINGENBERG (21) angegebenen Cytochromkonzentrationen für das Rattenhirn liegen unter den von uns für das Meerschweinchengehirn gefundenen Werten. Der Cytochromquotient von 1,2 stimmt mit dem von uns ermittelten Wert überein.

c. Redoxstatus in vivo und Hypothermie von18° C

Der Redoxstatus der Cytochrome a, b und c wurde nach der auf Seite 20 beschriebenen Methode bei 18° C Hirntemperatur ermittelt, Tabelle 7

Redoxstatus:	Cytochrom a	-	5,5 % reduziert
	Cytochrom b	-	16,4 % reduziert
	Cytochrom c	-	8,7 % reduziert

Das EEG - Bild zeigte bei dieser Temperatur noch keine pathologischen Veränderungen (KNAUST [11]).

d. Cytochromkinetik bei Hypothermie

Auf Abbildung 17 ist das Verhalten der Cytochrome a, b und c bei Ischämiezyklen aufgetragen. Dabei erkennt man, daß bei Ischämiebeginn Cytochrom a und c sich sofort reduzieren, während b erst nach 45 sec mit der Reduktion beginnt. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die Auswertung des Cytochrom b durch Haemoglobin stark beeinflußt wird (Seite 20). Weiter sieht man, daß Cytochrom a nach 3 min völlig reduziert ist, c und b aber erst 15 sec später.

Bei der Oxydation beginnen die Cytochrome a und c wieder gleichzeitig, während b erst nach 12 sec beginnt, dafür aber nach 28 sec bereits voll oxydiert ist. Dann folgt Cytochrom c nach 60 sec und a nach 68 sec. Cardiazol und Strychnin hatten bei 18 ° C keinen signifikanten Einfluß auf Oxydations- und Reduktionszeit. Nach einer Gabe von 0,5 ml 1molarer Amytallösung

Cytochromkonzentrationen

Nr.	Rinde			Gesamthirn			weiße Substanz			Thalamus		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	12,5	22,8	15,0	10,0	18,3	12,4	12,5	13,6	12,5			
2	12,0	19,1	15,0	10,0	16,4	13,2	11,3	17,8	12,7			
3	16,6	21,1	18,5	12,6	15,3	14,2	10,4	12,5	13,2			
4	13,7	30,4	15,8	14,2	22,5	17,9	10,0	15,3	14,7			
5	19,2	24,2	22,2	12,5	20,9	12,8	8,5	14,7	11,1			
6	15,0	18,9	18,2	11,8	21,0	16,0	11,7	17,7	13,7			
7	12,4	24,5	15,8	13,4	20,2	14,4	11,2	14,9	15,5			
8	13,3	22,4	17,9	15,8	18,3	18,4	10,8	13,0	12,7			
9	16,3	20,8	18,6	12,5	14,5	19,0	8,5	12,6	10,5			
10	14,9	17,9	16,0	13,3	15,7	16,8	10,2	16,6	12,6	8,1	10,0	11,8
11	15,1	19,4	18,8	13,0	15,4	15,9	10,5	17,2	13,8	8,1	12,1	11,1
12	14,4	19,7	17,9	12,5	14,9	15,8	10,9	13,5	14,4	9,6	12,9	11,4
13	11,7	23,3	17,9	12,5	18,1	15,8	13,7	16,9	16,1	12,5	10,5	14,2
14	12,5	23,0	18,9	13,7	17,5	16,4	10,6	14,3	16,8	10,8	12,4	12,6
15	16,3	16,9	22,1	14,4	13,2	15,8	11,4	16,8	12,7	10,3	13,0	13,2
16	13,7	21,0	15,8	13,7	19,2	13,9	12,3	12,9	14,8	8,9	9,8	11,8
	14,4	21,6	17,8	12,9	17,5	15,6	10,9	13,3	13,8	9,8	11,5	12,3
	± 2,04	±2,3	±2,2	±1,5	±2,7	±2,0	±1,3	±2,6	±1,8	±1,6	±1,4	± 1,1

Tabelle 6

Die angegebenen Werte wurden auf $\frac{\text{n Mol}}{\text{g fr}}$ umgerechnet.

Nr.	Tier	Cyt. a	Cyt. b	Cyt.c
1	T 92	7,8	19,8	12,2
2	T 96	4,8	16,4	8,9
3	T 96	3,7	12,2	6,5
4	T 96	3,8	12,8	6,5
5	T 96	3,5	10,5	5,5
6	T 96	4,2	14,2	7,0
7	T 97	9,4	18,8	14,3
8	T 99	7,1	14,2	9,2
9	T 100	-	8,5	3,2
10	T 107	5,9	13,6	8,5
11	T 110	7,0	12,1	10,2
12	T 111	5,4	14,3	8,5
13	T 113	8,5	17,2	12,7
14	T 119	3,9	16,8	8,0
15	T 119	6,1	18,0	12,7
16	T 121	4,4	12,8	8,0
17	T 121	2,1	10,1	5,3
18	T 122	5,5	12,5	8,3
19	T 123	4,5	16,5	6,5
20	T 125	4,7	18,3	7,3
21	T 129	6,0	14,4	8,8
22	T 130	7,3	16,5	10,4
23	T 131	7,6	15,2	9,0
		6,0 %	16,4 %	9,0 %
		± 1,8	± 2,9	± 2,5

Tabelle 7

In dieser Tabelle sind mit Hilfe von 23 Meßwerten die Redoxzustände der Cytochrome in vivo am haemoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirn (Reflektionsspektrum in vivo) ermittelt worden.

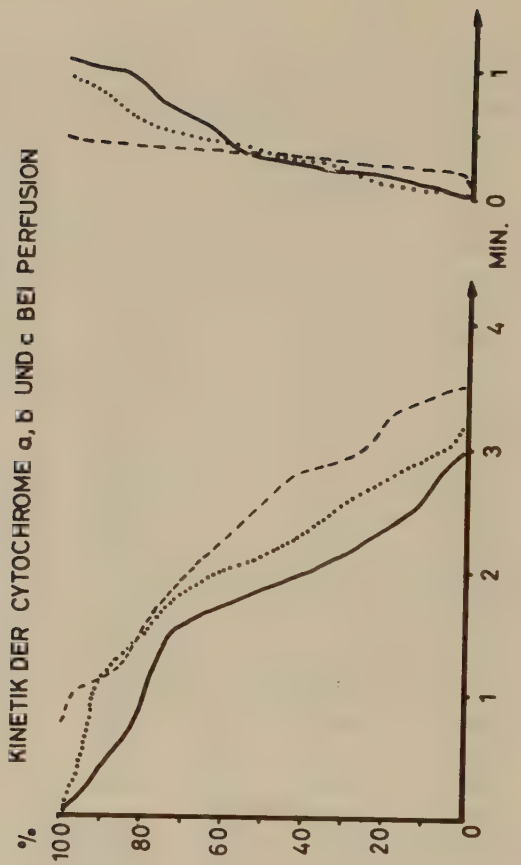

Abb. 17
Cytochrom a - durchgezogene Linie
Cytochrom b - gestrichelte Linie
Cytochrom c - gepunktete Linie
Die linke Kurve zeigt die Cytochrome zur Zeit Null 100%ig mit Sauerstoff gesättigt. Es erfolgt Perfusionsstop und Reduktion. Die rechte Seite zeigt die schnelle O_2-Sättigung.

in den zuführenden Katheter sahen wir noch keine Wirkung, aber nach einer Gabe von 0,1 ml Amytal trat eine Reduktion erst nach 8 min ein und nach 1 ml trat überhaupt keine Reduktion mehr ein.

e. Cytochromkonzentrationen am menschlichen Gehirn

Wie oben beschrieben, wurden am menschlichen Hirnmaterial Messungen durchgeführt. Die Hirnsubstanz erhielten wir aus dem Sektionssaal. Die gewonnenen Werte sind größer als die Cytochromkonzentrationen des Meerschweinchengehirns. Cytochrom b wurde nicht bestimmt, Tabelle 8

Zur Errechnung der Cytochromkonzentrationen wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten verwendet:

Cytochrom a - 24 (5)

Cytochrom b - 13,2 (6)

Cytochrom c - 19 (6)

Nr.	Rinde		weiße Substanz	
	a	e	a	c
1	31,0	34,2	15,0	23,8
2	12,5	15,8	20,0	23,6
3	21,5	26,2	18,5	21,0
4	25,0	31,6	18,8	23,0
5	21,8	26,0	19,1	25,2
6	31,0	36,0	20,8	26,4
7	25,0	31,0	22,0	27,9
8	14,5	21,0	12,5	15,8
9	11,2	15,7	18,6	15,8
10	12,5	26,4	16,0	21,0
11	15,6	23,7	12,5	19,0
	20,1	26,1	17,6	22,0
	± 7,3	± 7,2	± 3,2	± 3,9
	F = 1,3		F = 1,25	

Tabelle 8
Die Werte sind ebenfalls in $\frac{n\ Mol}{g\ fr}$ gemessen worden.
Am menschlichen Gehirn wurden nur die Konzentrationen der Cytochrome a und c bestimmt.

Meerschweinchen			Mensch
Gesamthirn	Cyt. a 12,9 Cyt. b 17,5 Cyt. c 15,6	F = 1,21	
Hirnrinde	Cyt. a 14,4 Cyt. b 21,6 Cyt. c 17,8	F = 1,24	20,1 26,1
weiße Substanz	Cyt. a 10,9 Cyt. b 13,3 Cyt. c 13,8	F = 1,26	17,6 22,0
Thalamus	Cyt. a 9,8 Cyt. b 11,5 Cyt. c 12,3	F = 1,26	

Tabelle 9

Die angegebenen Werte wurden in $\frac{\text{n Mol}}{\text{g fr}}$ gemessen. Zur Errechnung der Konzentrationen wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet. Für Cyt. a ist ε_m = 24

Für Cyt. b ist ε_m = 13,2

Für Cyt. c ist ε_m = 19

fr = Frischgewicht

F = Cytochromquotient

IV. Diskussion

Mißt man die Reflektionsspektren der Hirnrinde eines Meerschweinchens in situ, so ist die Konzentration des Haemoglobins so stark, daß das Haemoglobinspektrum die Atmungsfermentspektren überdeckt. Wir haben daher gemeinsam mit KNAUST eine Methode erarbeitet, die es erlaubt, das Meerschweinchengehirn haemoglobinfrei zu perfundieren. Da das haemoglobinfreie Medium nicht genug Sauerstoff enthält, um das Gehirn ausreichend zu versorgen, wurde der Sauerstoffverbrauch durch Senken der Temperatur systematisch verringert. Obwohl nach unseren Abschätzungen die Sauerstoffzufuhr dem Bedarf des Gehirns bei 25 ^{o} C hätte genügen müssen, fanden wir, daß man die Hirntemperatur bis 18 ^{o} C senken muß, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu erhalten. Dabei ist der venöse Sauerstoffdruck noch 200 Torr. Das Gehirn hat demnach eine Kapillarkonstruktion, die einen beträchtlichen Gegenstromanteil besitzen muß, so daß es zu einer Sauerstoffkurzschlußdiffusion kommt. Wir konnten am Oxydationsgrad der Atmungsfermente erkennen, ob eine ausreichende Perfusion erreicht war. Eine Vergrößerung des Perfusionsvolumens führte schnell zu Oedemen, so daß nur eine Sauerstoffverbrauchssenkung durch Temperatursenkung auf 18^{o} C eine regelrechte Sauerstoffversorgung ermöglichte.

Bei den in Hypothermie perfundierten Hirnen konnten die Spektren der Atmungsfermente sehr gut gemessen werden,

Abb. 1

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß sich aus den Reflektionsspektren die Konzentrationen hinreichend genau ermitteln lassen. Dies wurde folgendermaßen nachgewiesen: Von der Gehirnstelle, von der ein Reflektionsspektrum aufgenommen war, wurde ein Homogenat hergestellt und die Konzentration im reflektierten und im durchfallenden Licht gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß sich die in den Homogenaten gemessenen Werte mit einem empirisch gemessenen Faktor aus den Konzentrationen die im Reflektionsspektrum gemessen wurden, ermitteln lassen. Dieser Faktor gilt nur für ein bestimmtes Gewebe, da er jeweils spezielle Reflektionsbedingungen berücksichtigt.

Die Eindringtiefe des Lichtstrahles bei unseren photometrischen Messungen liegt zwischen 0,5 und 1 mm. Dies wurde durch Gewebsschnitte von verschiedener Dicke festgestellt. Zu ähnlichen Resultaten kommt man bei Haemoglobinauswaschkurven (WODIGK, SCKWICKARDI, LÜBBERS, unveröffentlichte Versuche) wobei eine Eindringtiefe von 0,8 mm errechnet wurde. Außerdem ergibt sich rein rechnerisch ein ähnlicher Wert aus dem oben erwähnten Faktor von 3,19. Bei der Reflektionsphotometrie wurde daher vorwiegend die Hirnrinde erfaßt, die ca. 1 mm stark ist bei unserem Meßareal.

Wir schätzen die durch unser technisches Vorgehen verursachte Fehlerbreite auf 4%. Durch zeichnerische Ungenauigkeit kommt für Cytochrom a und c noch ein Fehler von 5% hinzu, für Cytochrom b von 8 - 10%. Für Cytochrom a und c ergibt sich also ein Fehler von ca. 10%, für Cytochrom b von ca. 15%.

Die Konzentrationsbestimmung wurde in der üblichen Verdünnung von 1 : 10 vorgenommen, dabei ist es problematisch, ob hierfür das Lambert-Beer'sche Gesetz angewandt werden darf in seiner einfachen Form. Hierzu einige orientierende Versuche, die in Tabelle 10 aufgeführt sind (Verdünnungsversuche), wobei bemerkt werden muß, daß die Verdünnung mit einer normalen 2 ccm Glasspritze hergestellt wurden. Man sieht, daß die Verdünnung größer als 1 : 5 sein sollte und daß bei größeren Verdünnungen keine systematischen Fehler auftreten. Dieses Problem müßte in weiteren systematischen Versuchen noch näher analysiert werden. Für unsere Fragestellung zeigte die Synthese der Spektren eine ausreichende Genauigkeit (Abb. 15 S. 34).

Die früheren Angaben in der Literatur ergaben für die Atmungsfermentkonzentrationen niedrige Werte. Dies dürfte zum Teil, wie Klingenberg zeigte (21), durch die Methodik bedingt gewesen sein. Die von Klingenberg (8, 21) angegebenen Werte für Ratten und Affenhirn liegen etwas unter den von uns gefundenen Konzentrationen für Mensch- und Meerschweinchengrhirn, jedoch kann das auf Speziesunterschieden beruhen. Das Verhältnis der Cytochromquotienten entspricht den von Klingenberg angegebenen Werten.

Die Redoxzustände der Atmungsfermente bei Hypothermie und normaler Hirntätigkeit stimmen mit den von Jöbsis (7) gefundenen Werten überein.

Die Messung der Kinetik der Atmungsfermente (Abb. 17 S. 40) zeigt, daß die einzelnen Cytochrome eine unterschiedliche Kinetik bei Perfusionsunterbrechung haben.

Verdünnung		1 : 5		1 : 10		1 : 20		1 : 40	
	Nr.		MW		MW		MW		MW
Gesamthirn	1	15,2		14,9		14,3			
	2	13,7	15,2	17,4	15,5	13,8	13,7		
	3	16,8		14,2		13,0			
Hirnrinde	1			19,9		20,4		15,9	
	2			18,5	19,3	19,6	19,4	16,8	16,0
	3			19,5		18,3		15,4	
weiße Subst.	1			12,1		10,9			
	2			11,3	11,8	10,4	11,0		
	3			11,9		11,6			
Thalamus	1			9,4		8,7			
	2			10,8	10,2	9,2	8,9		
	3			10,5		8,8			

Tabelle 10 Zur Frage der Gültigkeit des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes wurden Verdünnungsversuche gemacht. Jeder aufgeführte Wert ist der Mittelwert aus drei Messungen, der Mittelwert MW damit aus neun Messungen. Für 1 : 5 Verdünnungen war nur beim Gesamthirn genügend Substanz vorhanden. Nur der hohe Atmungsfermentgehalt der Hirnrinde ermöglichte noch die Auswertung der aufgezeichneten Spektren.

Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß das untersuchte Feld ca 1 cm^2 groß ist. Dadurch werden nicht nur zeitliche Veränderungen erfaßt, sondern auch die räumlichen Unterschiede, die durch das Sauerstoffdruckfeld bedingt sind.

Bei schlechter sauerstoffversorgten Gehirnen wurde die Einwirkung einiger Pharmaka untersucht. Dabei führte eine H_2O_2 Gabe (11) zu einer erheblichen Verbesserung der Sauerstoffversorgung, was in einer deutlichen Oxydation der Atmungsfermente zum Ausdruck kommt. Im Mittel fiel der Reduktionsgrad der Cytochromoxydase von 35 % auf 7 % bei Cytochrom a und bei Cytochrom c von 35 % auf 6 % (Tab. 11 S. 49)

Bei Cardiazol kommt eine verstärkte Hirntätigkeit hinzu, die sich im EEG zeigt (11). Dabei wird die Reduktion ebenfalls geringer und zwar für Cytochrom a um 7 % und für Cytochrom c um 12 %, dies entspricht einem Zustand mit größerer Sauerstoffaufnahme. Die Verbesserung der Sauerstoffversorgung kann durch eine zusätzliche Kreislaufwirkung des Cardiazols erklärt werden. Nach Strychnin Injektion trat auch eine verstärkte Hirntätigkeit auf, jedoch verschlechterte sich der Reduktionsgrad für Cytochrom a um 10 % und für Cytochrom c um 15 % (Tab.11, S. 49).

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß es mit unserer Technik gelingt, quantitative Messungen über Konzentration und Kinetik der Atmungsfermente in situ zu machen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß nur eine kleine Trepanation benötigt wird, da man außerdem die Dura mater nicht zu eröffnen braucht, herrschen weit -

Nr.	Cardiazol				Strychnin				H_2O_2			
	Cyt.a		Cyt. c		Cyt.a		Cyt. c		Cyt. a		Cyt. c	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
1	34 %	+6 %	28 %	+9 %	18 %	-9 %	16 %	-10 %				
2	22 %	+5 %	20 %	+8 %	25 %	-7 %	24 %	-12 %	22 %	+20 %	24 %	+18 %
3	28 %	+5 %	30 %	+11 %	20 %	-5 %	23 %	- 8 %	38 %	+32 %	33 %	+30 %
4	20 %	+7 %	22 %	+14 %	6 %	-13 %	8 %	-20 %	42 %	+28 %	40 %	+30 %
5					15 %	-7 %	21 %	-15 %	55 %	+39 %	56 %	+45 %
6	50 %	+14 %	42 %	+20 %	18 %	-10 %	18 %	-15 %				
7	35 %	+6 %	31 %	+15 %	30 %	-8 %	26 %	-10 %	31 %	+30 %	35 %	+28 %
8	21 %	+5 %	17 %	+10 %	0 %	-22 %	5 %	-25 %	28 %	+17 %	24 %	+20 %
MW		+ 7 %		+ 12 %		- 10 %		- 15 %	35 %	+ 28 %	35 %	+ 29 %

Tabelle 11 Es wurde bei einigen Versuchen die Wirkung der oben aufgeführten Pharmaca ausgewertet. Mit "vor" wird der Reduktionszustand bezeichnet und dann die Pharmacawirkung mit "nach". Dabei zeigt sich für Cardiazol und H_2O_2 eine Abnahme (+) des Reduktionsgrades, während Strychnin eine Zunahme des Reduktionsgrades bewirkt. Die angegebenen Werte sind nicht bei ausreichend Sauerstoff versorgten Gehirnen gewonnen worden, deswegen ist die Kreislaufreaktion mit von Bedeutung.
Die Injektionen wurden vorgenommen mit 1ml Cardiazol; 1ml Strychnin; 1ml H_2O_2 Lösung (8)

gehend physiologische Bedingungen.

Der Nachteil ist, daß man hämoglobinfrei oder hämo - globinarm und bei niedrigen Temperaturen arbeiten muß. Vielleicht gelingt es durch Arbeit in Hyperoxie ähnliche Versuche bei normaler Temperatur auszuführen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird eine Methode beschrieben, nach der es möglich ist, die Konzentrationen und die Kinetik der Atmungs - fermente in situ zu messen. Dazu wird eine hämoglobin - freie Perfusion in Hypothermie angegeben. Vergleichs - messungen an Hirnhomogenaten zeigen, daß es gelingt, einen Faktor zu bestimmen, der es erlaubt, aus dem in situ gemessenen Reflektionsspektrum die absoluten Konzentrationen zu ermitteln.

2. Unter den oben beschriebenen Bedingungen ist der Redox - zustand der Atmungsfermente bei normaler Hirntätigkeit bestimmt worden.

   Cytochrom a - 5,5 % reduziert

   Cytochrom b - 16,4 % reduziert

   Cytochrom c - 8,7 % reduziert

3. Die Konzentration der Atmungsfermente in verschiedenen Arealen des Meerschweinchengehirns wurde sowohl im Homogenat als auch in situ bestimmt. Die dazu not - wendigen Auswertmethoden werden ausführlich beschrieben.

4. Am menschlichen hämoglobinhaltigen Hirnhomogenat wurden ebenfalls die Atmungsfermentkonzentrationen ermittelt, die deutlich höher sind als die im Meerschweinchen - gehirn gefundenen Werte.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BLOOR,B.M., W.E. NEVILLE, F.R. HELLINGER and G.H.A. GLOWES, Jr. : Oxygen tension of the brain and its modification with hypothermia
Archiv für Psychiatrie und Zeitschrift f. d. ges. Neurologie 204, 310-316 (1963)

2. CHANCE, B. : Spektrophotometry of intracellular respiratory pigments
Science 120, 767-775 (1954)

3. EMMENEGGER, H.,M. TAESCHLER und A. CERLETTI : Neue Möglichkeit der isolierten Hirndurchströmung
Helv. physol. pharmacol. Acta 21, 239-244 (1963)

4. FABEL, H. D.W. LÜBBERS : Measurment of Reflection Spektra of the Beating Rabbit Heart in situ
Medizinische Zeitschrift 341, 351-356 (1965)

5. GELDER, B. van, E. SLATER : The ExtinctionsCoefficients of Cytochromes a and a_3
Informatio Exchange Group No 1 (1965)

6. GOLDBERGER, R, D.E. GREEN : Properties and Function of Mammalian Cytochromes b and c_1
In : The Enzymes 91 New York 1963

7. JÖBSIS, F.F. : Spektrophotometric studies in intact muscle II. Recovery from contractile activity
J. Gen. Physiol. 46, 929-969 (1963)

8. KLINGENBERG, M. : Muskelmitochondrien
Ergebnisse der Physiologie, Bd. 55, 131 (1964)
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg

9. KLINGENBERG, M.,P. SCHOLLMEYER : Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung
Biochem. Z. 333, 335-350 (1960)

10. KLINGENBERG, M. : Zur Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung
II. Biochem. Z. 335, 231-242 (1961)
III. Biochem. Z. 335, 243-262 (1961)
IV. Biochem. Z. 335, 263-272 (1961)

11. KNAUST, K. : Sauerstoffversorgung des hämoglobinfrei perfundierten Meerschweinchengehirns bei Normo- und Hypothermie
Dissertation Marburg 1967

12. LEHNINGER, A.L. : In : The Mitochondrion
New York 1964

13. LÜBBERS, D.W., H. FABEL : Redoxveränderungen der Atmungskette während Normoxie und Hypoxie am schlagenden Warmblüterherzen in situ
Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für Kreislaufforschung, 30. Tagung 198-201 (1964)

14. LÜBBERS, D.W., D. INGVAR, E.BETZ, H. FABEL, M. KESSLER, F.W. SCHMAL :Sauerstoffverbrauch der Großhirnrinde in Schlaf- und Wachzustand beim Hund
Pflügers Arch. ges. Physiol. 281, 58 (1964)

15. LÜBBERS, D.W., M. KESSLER, R. SCHOLZ and Th. BÜCHER : Cytochrome Reflection Spectra and Fluoreszence of the Isolated, Perfused, Hemoglobin-free Rat Liver during a Cycle of Anoxia
Biochem. Z. 341, 346-350 (1965)

16. LÜBBERS, D.W., M. KESSLER, K. KNAUST, D.G. Mc DOWALL and R. WODICK: Die Verwendung von Wasserstoff und Sauerstoff zur Messung der Lokalen Gewebedurchblutung in situ mit der Platinelektrode
Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, 99 (1966)

17. LÜBBERS, D.W., W. NIESEL : Der Kurzzeit- Spektralanalysator. Ein schnellarbeitendes Spektralphotometer zur laufenden Messung von Absorption- bzw. Extinktionsspektren
Pflügers Arch. ges. Physiol. 268, 286-295 (1958/59)

18. NIESEL, W., D.W. LÜBBERS, D. SCHNEEWOLF, J. RICHTER, W. BOTTICHER : Double beam spectrometer with 10 msec recording time
Rev. sci. Instrum. 35, 578-581 (1964)

19. NIESEL, W., G. THEWS, D.W. LÜBBERS : Die Messung des zeitlichen Verlaufs der O_2-Aufsättigung und Entsättigung menschlicher Erythrcyten mit dem Kurzzeit-Spektralanalysator
Pflügers Arch. ges. Physol. 268, 296-307 (1959)

20. SCHMIDT, K., W. NIESEL : Messung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins am durchbluteten Gewebe im reflektierten Licht mit dem Rapidspektroskop
Pflügers Arch. ges. Physiol. 280, 369-372 (1964)

21. SCHOLLMEYER, P., M. KLINGENBERG : Über den Cytochromgehalt tierischer Gewebe
Biochem. Z. 335, 426-439 (1962)

22. YONETANI, T.; The a-type Cytochromes
In: The Enzymes **New York 1963**

23. ZÜLCH, K.J.; Gibt es Spasmen der Hirngefäße?
Dtsch. med. Wschr. 14, 622-626 (1959)

NACHTRAG

24. KLINGENBERG, M., D.W. LÜBBERS : Oxydative Endstrecke des Stoffwechsels
In: Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie
Ferdinant Enke Verlag Stuttgart 1966

An dieser Stelle möchte ich meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. D. W. Lübbers, für die Überlassung des Themas und für seine vielen wertvollen Anregungen herzlich danken. Den Angehörigen des Instituts danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und für die Bereitstellung aller für meine Versuche benötigten Geräte.

Lebenslauf

Am 11. November 1939 wurde ich in Kassel als Sohn des Kaufmanns Gerhard Schwickardi und seiner Ehefrau Marga geboren.
Nach einem Bombenangriff im Jahre 1943 wurden wir evakuiert und ich besuchte die Volksschule in Altenhagen II am Deister. Anschließend ging ich vier Jahre in die Mittelschule in Bad Münder und die letzten zwei Jahre bis zur Mittleren Reife in die Knabenmittelschule zu Kassel, wohin wir 1955 zurückgekehrt waren. Da ich gerne Medizin studieren wollte, besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige, das ich nach bestandenem Abitur im Jahre 1961 verließ. Während dieser Zeit arbeitete ich tagsüber als Kraftfahrer, um mir das Geld für mein Studium zu verdienen.
Ich studierte elf Semester Medizin in Marburg und habe mein Studium im Sommer 1967 mit dem medizinischen Staatsexamen beendet.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die
Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Beckmann, Berendes, Betz, Bommer, Braun-Falco,
Brück, Bücher, Buchholz, Dimroth, Dittrich, Drawert,
du Mesnil, Exner, Gedigk, Hamm, Hardewig, Hensel,
Heuser, Herrmann, Hildebrandt, Hohorst, Jakob,Kessel,
Klingenberg, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers,
Mahr, Mann, Martini, Mattes, Marx, Neubauer, Niessing,
Oehmig, Petry, Rodeck, Rohen, Salfeld, Sauer, Schadewald,
Schiff, Schleyer, Schmid, Schrappe, Schultze, Schwaiger,
Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Stender, Straub,
Streicher, Walcher, Wendt, Würterle.